



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP)

Instituto de Biologia – Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia

---

### Projeto de Iniciação Científica

## “PAPEL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO T-BET NO PERFIL DE MACRÓFAGOS DO TECIDO ADIPOSEO E SUAS IMPLICAÇÕES NA RESISTÊNCIA À INSULINA INDUZIDA PELA OBESIDADE”

Bolsista: Mirella Cristiny Pereira de Andrade

Supervisor: Pedro M. M. Moraes Vieira

Campinas-SP/2020

### RESUMO DO PROJETO

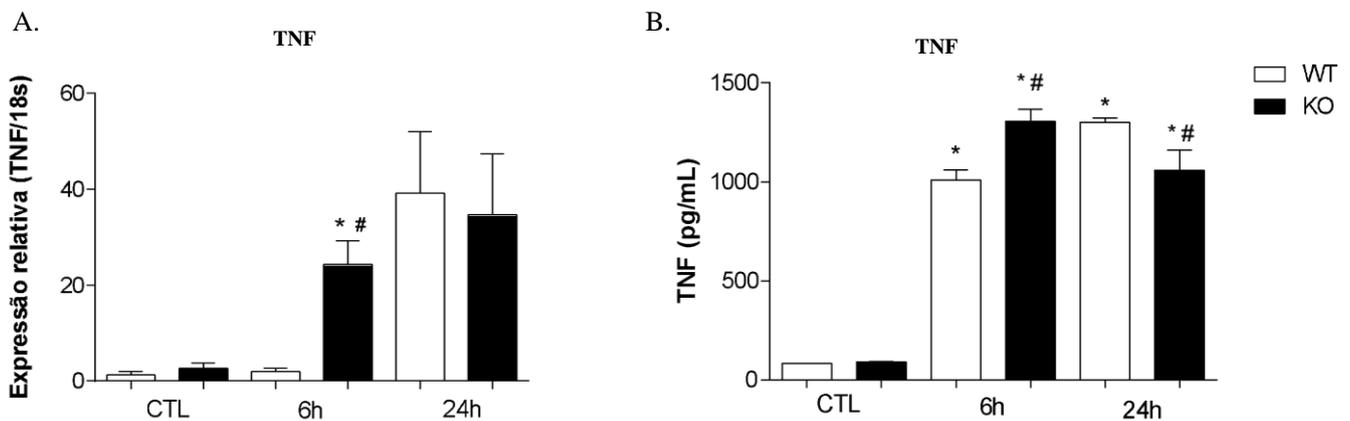
A obesidade tem sido considerada uma epidemia global, afetando milhões de indivíduos no mundo todo. O aumento patológico de peso pode afetar os diversos sistemas, como: o cardiovascular, endócrino e também o sistema imune. A expansão do número/tamanho de adipócitos que ocorre durante a obesidade, é acompanhada pelo infiltrado de células imunes neste tecido, gerando uma inflamação de baixo grau que está associada com a resistência à insulina. Macrófagos são células com papel importante durante o curso da obesidade, sendo que macrófagos de perfil M1, que são pró-inflamatórios e glicolíticos, aumentam no tecido adiposo obeso. O fator de transcrição T-bet é conhecido por regular a diferenciação de células Th1, porém, recentemente esse fator foi descrito por ter um papel na sensibilidade à insulina e também por influenciar a produção de TNF em células dendríticas. Assim, escolhemos o modelo de resistência à insulina associado à obesidade para compreender o papel de T-bet em macrófagos.

Tivemos como objetivo principal determinar o papel do fator de transcrição T-bet em macrófagos durante a obesidade, e para isso avaliamos o papel desse fator de transcrição de duas formas: a primeira foi analisando a função do fator de transcrição na ativação de macrófagos através da expressão de citocinas pró e anti-inflamatória, assim como de genes da via glicolítica e marcadores de ativação em

macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) de animais WT e T-bet (Tbx21 floxed/LysMcre+), ativados com LPS.

### Deleção de T-bet em macrófagos modula a expressão e a secreção de TNF

Tendo em vista que o T-bet é capaz de reprimir TNF em células dendríticas e que não há trabalhos na literatura mostrando o efeito da deleção desse fator de transcrição em macrófagos, nosso primeiro passo foi avaliar a secreção e expressão de TNF em macrófagos derivados da medula óssea de animais selvagens e nocautes para T-bet após ativação com LPS. Observamos que a deleção de T-bet levou ao aumento significativo da expressão gênica de TNF após 6 horas, mas não após 24h (Figura 1A). Além disso, a secreção de TNF também encontra-se elevada após 6h de estímulo, mas não após 24 horas de ativação (Figura 1B). Em conjunto tais dados sugerem que a deleção de T-bet leva a maior produção de TNF em curtos períodos de tempo, mas o estímulo prolongado acarreta em semelhante ativação.



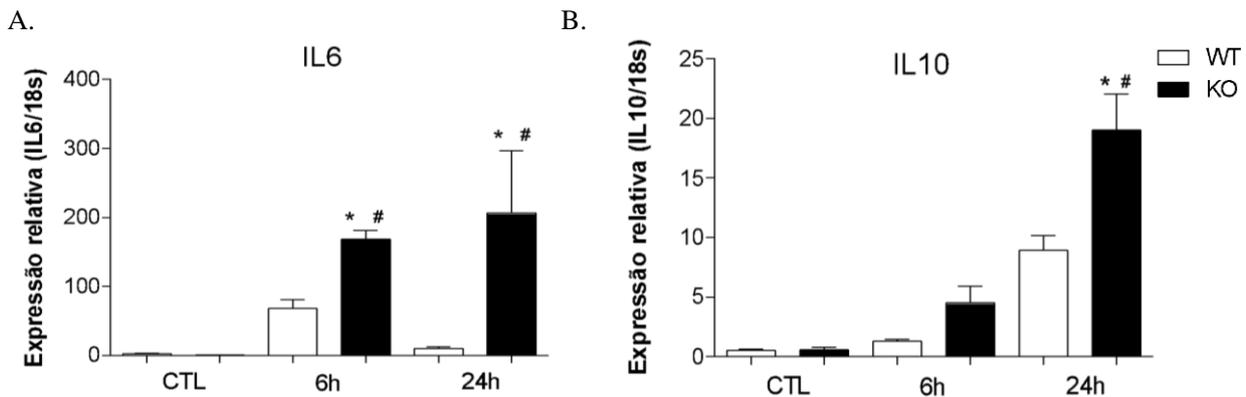
**Figura 1. Modulação da deleção de Tbet na expressão e secreção de TNF.** Macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos nocautes T-bet (Tbx21 floxed/LysMcre+) e seus controles com 8 semanas de idade, foram estimulados com LPS em tempos de 6 e 24 horas e a expressão genica (A) e secreção (B) de TNF foi avaliada nesses tempos. Resultados apresentados como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle, # $p < 0.05$  em relação ao grupo WT tratado, teste t student e ANOVA de um critério de classificação com post test de Tukey.

### Genes ligados a resposta pró e anti-inflamatória são modulados na ausência de T-bet

Para entender melhor o perfil desses  $M\phi^{\Delta Tbet}$  e verificar se há ou não modulação gênica no perfil de outras citocinas pró-inflamatórias, avaliamos a expressão genica de Il-6. Observamos expressão aumentada nos macrófagos  $M\phi^{\Delta Tbet}$  em 6 e 24 horas após estímulo com LPS (Figura 2A).

Sabe-se que a IL-10 é produzida por macrófagos como um mecanismo de feedback negativo para regular a produção excessiva de fatores pró-inflamatórios. Observamos maior expressão de Il-10 em ambos os tempos de estímulo (Figura 2B). Isso nos leva a pensar que a ausência de T-bet e consequente ausência na repressão de TNF leve a uma ativação antecipada desses macrófagos, com alta produção de citocinas inflamatórias logo nas primeiras horas, mas que também antecipa a produção de fatores regulatórios, como a IL-10. Portanto, talvez a diminuição nos níveis de TNF

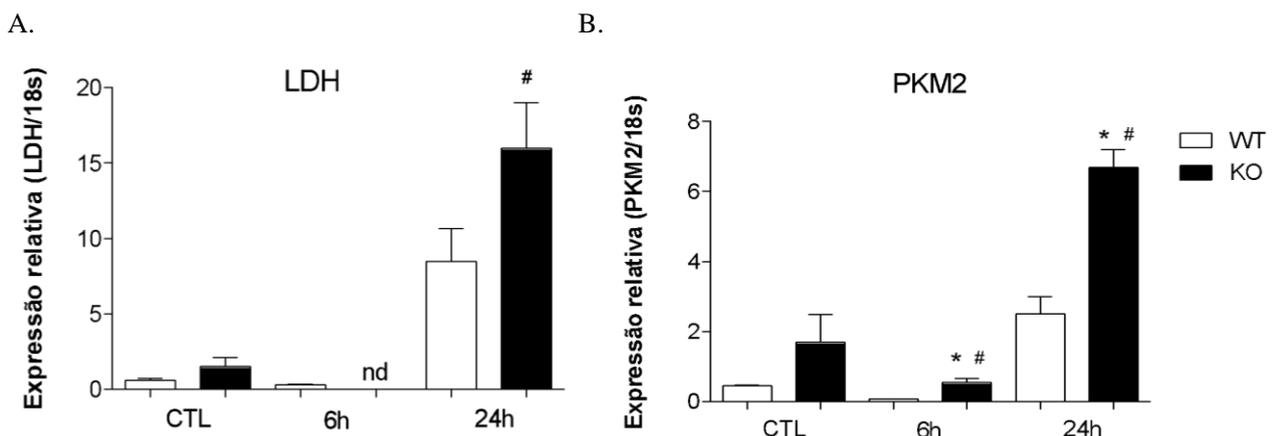
observada em 24h seja resultado do aumento da expressão de IL-10 nos macrófagos  $M\phi^{\Delta Tbet}$ , levando à supressão de TNF em 24h.



**Figura 2. Perfil de expressão de genes pró e anti-inflamatórios.** Macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos nocautes T-bet (Tbx21 floxed/LysMcre+) e seus controles com 8 semanas de idade, foram estimulados com LPS em tempos de 6 e 24 horas para quantificação de expressão de genes pró (A IL-6) e anti-inflamatórios (B IL-10). Resultados apresentados como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle, # $p < 0.05$  em relação ao grupo WT tratado, teste t student e ANOVA de um critério de classificação com post test de Tukey.

### Enzimas da via glicolítica são moduladas após estímulo na ausência de T-bet

Como observamos que a ausência de T-bet em macrófagos leva a um aumento na expressão e produção de citocinas pró-inflamatórias, decidimos avaliar se enzimas importantes para o metabolismo glicolítico de macrófagos após ativação também estariam alteradas. Verificamos que a expressão de Ldh-a e Pkm2 (enzimas chave para o processo de glicólise) está aumentada nos macrófagos  $M\phi^{\Delta Tbet}$  após 24 horas do estímulo com LPS, indicando que a glicólise está aumentada nessas células e demonstrando a relação com a maior ativação.



**Figura 3. Modulação da deleção de Tbet na via glicolítica.** Macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos nocautes T-bet (Tbx21 floxed/LysMcre+) e seus controles com 8 semanas de idade, foram estimulados com LPS em tempos de 6 e 24 horas para quantificação de expressão genica de genes de enzimas relacionadas a via glicolítica. (A) Enzima Lactato desidrogenase e (B) a enzima piruvato kinase M2. Resultados apresentados como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle, # $p < 0.05$  em relação ao grupo WT tratado, teste t student e ANOVA de um critério de classificação com post test de Tukey.

Nossa segunda forma de avaliar o papel desse fator de transcrição foi investigando o papel de T-bet na modulação de macrófagos residentes do tecido adiposo em animais obesos e resistentes à

insulina determinando o grau de inflamação no tecido adiposo, assim como a consequente resistência à insulina em animais  $M\phi^{\Delta Tbet}$  e animais controles (WT) submetidos à dieta hiperlipídica.

### A deleção de T-bet em células mieloide modula a resistência à insulina induzida pela obesidade

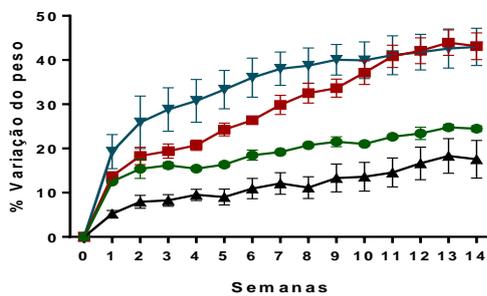
Animais T-bet KO e seus controles foram submetidos a dieta hiper lipídica (HFD, do inglês, *high fat diet*) por 14 semanas (Figura 4). Animais WT e T-bet KO tiveram peso corporal e ganho de peso semelhante quando alimentados com a mesma dieta (Figura 4A-B). Em seguida realizamos testes para avaliar a homeostase sistêmica da glicose.

Como já discutimos, a obesidade é acompanhada pelo infiltrado de células imunes, gerando uma inflamação de baixo grau que está associada com a resistência à insulina, e esta condição está associada a secreção de citocinas pró-inflamatórias, que com a deleção de T-bet se torna mais acentuada.

Observamos que a deleção de T-bet em macrófagos melhora a tolerância a glicose e a sensibilidade a insulina (Figura 4C-D), mesmo em jejum estes animais KO apresentam perfil glicolítico semelhante aos que durante o período foram submetidos a uma dieta comum (Figura 4E).

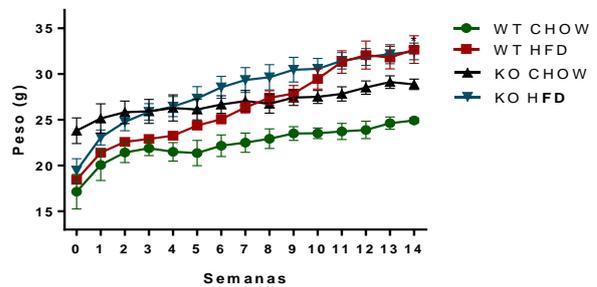
A.

Variação de peso



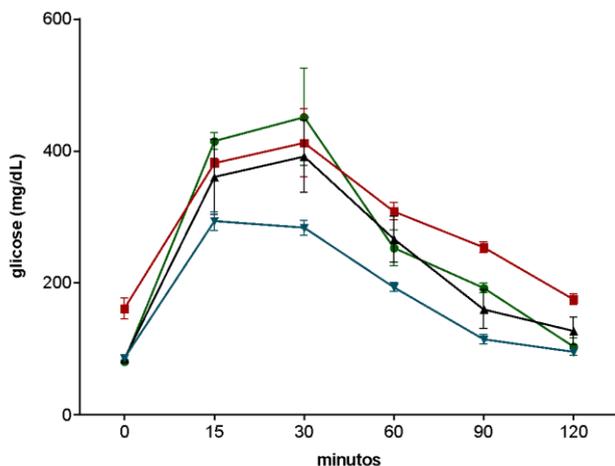
B.

Ganho de peso

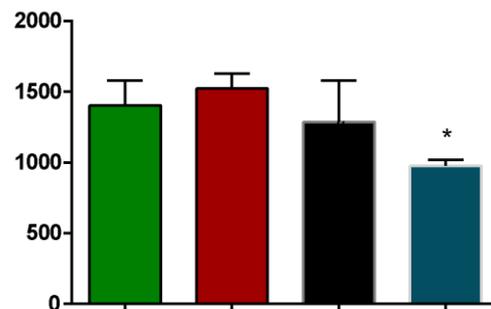


C.

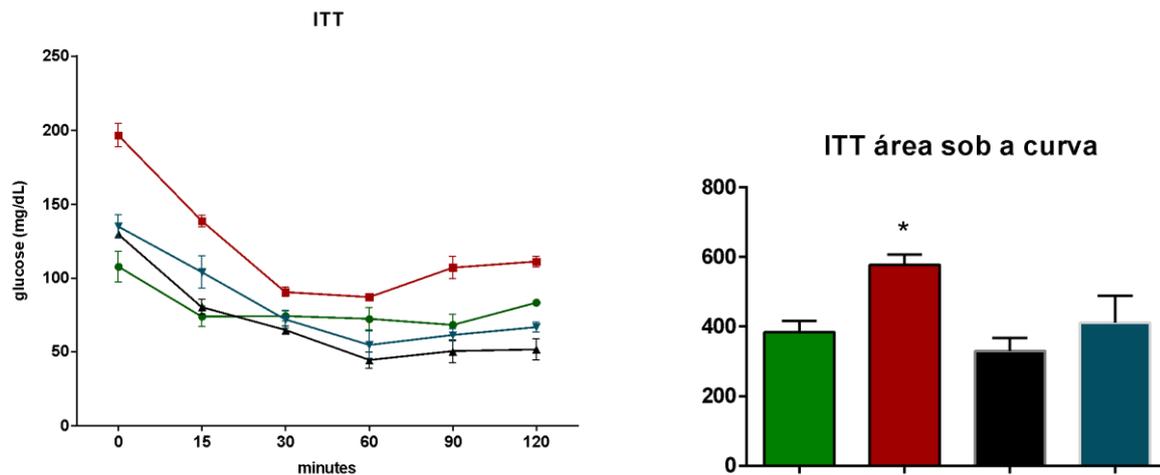
GTT



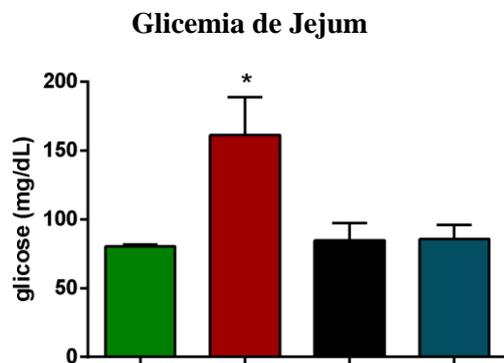
GTT área sob a curva



D



E.



**Figura 4. Efeito da dieta hiperlipídica (HFD) e alterações metabólicas nos animais T-bet<sup>KO</sup> e seu controle.** Análise da variação (A) e do ganho de peso (B) de camundongos nocautes para T-bet (Tbx21 floxed/LysMcre+) e seus controles tratados com dieta hiperlipídica (HFD) ou não. Análise de teste de tolerância a glicólise (GTT), seguido dos cálculos de área sob e curva (C) e teste de tolerância a insulina (ITT), seguidos dos cálculos de área sob a curva (D). Avaliação nos níveis de glicose após 12 horas de jejum (E), (n=4). Resultados apresentados como média ± SEM. \*p<0.05 em relação ao grupo WT, # p<0.05 em relação ao grupo WT tratado, teste t student e ANOVA de um critério de classificação com post test de Tukey. Resultados apresentados com base em dois experimentos independentes.

Nossos resultados sugerem que o fator de transcrição T-bet exerce função moduladora em macrófagos *in vitro*, levando a um aumento da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias mas sua deleção em células mieloides modula a homeostase sistêmica da glicose, ou seja, pode modular o perfil inflamatório no tecido adiposo.

## AGRADECIMENTOS

